



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
24.07.1996 Patentblatt 1996/30

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/54**, C12N 9/10,
C12Q 1/48, A01N 3/00,
C12N 1/21, C12N 5/10

(21) Anmeldenummer: 96100458.7

(22) Anmeldetag: 13.01.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL

(30) Priorität: 23.01.1995 DE 19501906

(71) Anmelder: BASF AKTIENGESELLSCHAFT
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:
• Schmidt, Ralf-Michael, Dr.
D-67434 Neustadt (DE)
• Stitt, Marc, Prof. Dr.
D-69221 Dossenheim (DE)
• Sonnewald, Uwe, Dr.
D-06467 Hoym (DE)

(54) **Transketolase**

(57) Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 darstellt, sowie für dieses Protein kodierende Nukleinsäuren und seine Verwendung.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine mit Transketolase Aktivität, ihre Verwendung in Testsystemen, sowie Nukleinsäuren, die für diese Proteine codieren.

Pflanzen sind in der Lage, unter Verwendung von Lichtenergie aus atmosphärischem Kohlendioxid organische Verbindungen unter Sauerstoffbildung aufzubauen. Dieser Vorgang wird als Photosynthese bezeichnet.

Es ist anzunehmen, daß die effiziente Bildung, Nutzung und Verteilung der Photosyntheseprodukte das Wachstum einer Pflanze stark beeinflussen.

Da Pflanzen auf eine funktionierende Photosynthese angewiesen sind und vergleichbare Reaktionen in tierischen Organismen nicht vorkommen, bietet sich der Photosyntheseapparat als ideales Ziel für den Einsatz von Herbiziden an.

Die komplexen Reaktionen, die zur Kohlendioxidfixierung führen unterteilt man in Licht- und Dunkelreaktion. Die Lichtreaktion dient der Bereitstellung von Energie in Form von ATP und von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. In der Dunkelreaktion (reduktiver Pentosephosphatzyklus oder Calvin Zyklus) werden diese Verbindungen zur Synthese organischer Kohlenstoffverbindungen genutzt.

Einige der bekannten Herbizide (z.B. Dichlorphenylmethylharnstoff oder Paraquat) wirken durch eine Inhibierung der Lichtreaktion. Die Dunkelreaktion wird als Angriffspunkt für Herbizide nicht genutzt.

Die Enzymreaktionen des reduktiven Pentosephosphatzyklus werden in drei Abschnitte unterteilt:

- a) Carboxylierung
- b) Reduktion
- c) Regenerierung.

Bei der Carboxylierung reagiert Kohlendioxid mit dem Akzeptormolekül Ribulose-Bisphosphat (RuBP), wodurch zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat

(3-PGA) gebildet werden. Anschließend wird 3-PGA nach Phosphorylierung zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) reduziert. In der Regenerationsphase wird das Akzeptormolekül RuBP aus dem entstandenen GAP resynthetisiert. Von sechs gebildeten Molekülen GAP kann ein Molekül für andere Stoffwechselwege eingesetzt werden.

Eine Vielzahl der am reduktiven Pentosephosphatzyklus beteiligten Enzyme stellen potentielle Angriffspunkte für Herbizide dar. Eine besondere Stellung nimmt allerdings die plastidäre Transketolase ein. Wie die Transaldolase katalysiert die Transketolase (E.C. 2.2.1.1.) zwei Reaktionen:

(1)

Fruktose-6-Phosphat + Glycerinaldehyd-3-Phosphat --> Erythrose-4-Phosphat + Xylulose-5-Phosphat

(2)

Sedoheptulose-7-Phosphat + Glycerinaldehyd-3-Phosphat --> Ribose-5-Phosphat + Xylulose-5-Phosphat

Die an den Reaktionen beteiligten Substrate und Produkte stellen Verknüpfungspunkte des reduktiven Pentosephosphatzyklus mit anderen Stoffwechselwegen dar. Exportierte Triosephosphate dienen im Zytoplasma als Substrate für Glykolyse und Gluconeogenese. Fruktose-6-Phosphat wird als Vorläufermolekül zur Herstellung von Stärke in den Plastiden genutzt. Erythrose-4-Phosphat ist ein Mittler zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. Verknüpft mit Phosphoenolpyruvat mündet Erythrose-4-Phosphat in den Shikimat-Weg, der zur Synthese aromatischer Aminosäuren und phenolischer Substanzen führt.

Ribose-5-Phosphat wird in unterschiedlichen Stoffwechselwegen als Substrat verwendet.

In pflanzlichen Geweben wurden zwei Transketolase-Isoformen beschrieben, die sich in ihrer subzellulären Kompartimentierung unterscheiden (Murphy and Walker, 1982, Planta 155, 316-320).

Die plastidäre Transketolase ist in grünen Geweben für mehr als 75% der Gesamtaktivität verantwortlich. Das aktive Enzym liegt als Homotetramer (Holoenzym) mit einer relativen Molekularmasse von 150 kDa vor. Als Cofaktoren benötigt die Transketolase Vitamin B1 (Thiaminpyrophosphat) und Magnesium. In Abwesenheit von Thiaminpyrophosphat oder in Anwesenheit von Mercaptoethanol zerfällt das Tetramer in zwei Dimere (Apoenzyme) mit einer relativen Molekularmasse von je 74 kDa. Holo- und Apoenzym sind katalytisch aktiv, wobei das Holoenzym eine wesentlich höhere Aktivität als das Apoenzym aufweist.

Gene, die für Transketolase kodieren, wurden bisher aus *Saccharomyces cerevisiae* (Flechter et al., Biochemistry 31, 1892-1896, 1993; Sundström et al., J. Biol. Chem. 268, 24346-24352, 1993; Schaff-Gerstenschläger et al., Eur. J. Biochem. 217, 487-492, 1993), aus *Hansenula polymorpha* (Janowicz et al., Nucl. Acids Res. 13, 3043-3062, 1985), menschlichen Erythrozyten (Abedinia et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 1159-1166, 1992; McCool et al., J. Biol. Chem. 268, 1397-1404, 1993), *Rhodobacter sphaeroides* (Chen et al., J. Biol. Chem. 266, 20447-20452, 1992)

und Escherichia coli (Sprenger, Biochem. Biophys. Acta 1216, 307-310, 1992; Tida et al., J. Bacteriol. 175, 5375-5383, 1993) isoliert und beschrieben. Gene pflanzlicher Transketolasen sind bisher nicht bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine pflanzliche Transketolase in reiner Form durch Klonierung des entsprechenden Gens zur Verfügung zu stellen.

5 Demgemäß wurde ein Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz, gefunden.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz beruht auf der Translation der in SEQ ID NO 1 dargestellten cDNA Sequenz.

Das in SEQ ID NO 2 dargestellte Protein ist ein sogenanntes Vorläuferprotein bestehend aus 743 Aminosäuren.
10 Das reife Protein ist aus der Vorläuferform durch Abspalten des chloroplastidären Transitpeptides, das gemäß einer Computeranalyse aus den N-terminalen 77 Aminosäuren besteht, erhältlich.

Sowohl das Vorläuferprotein, als auch durch Substitution, Deletion oder Insertion von Aminosäuren davon abgeleitete Proteine, die noch über eine Transketolase-Aktivität verfügen, gehören zu den erfindungsgemäßen Proteinen.

Unter Substitution ist der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere andere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure
15 eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Val durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung; bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

20 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch eine oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Besonders bevorzugt sind Proteine, die durch N-terminale Verkürzungen um 20 bis 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 entstehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, die für die oben genannten Proteine kodieren. Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code
25 erhältlich. Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Soll die pflanzliche Transketolase beispielsweise in einem Bakterium exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage des Bakteriums bei der Rückübersetzung zu verwenden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Vektoren, die die für die erfindungsgemäße Transketolase kodierenden Nukleinsäuren zusammen mit funktionellen Regulationssignalen enthalten.

Darunter sind beispielsweise Signale für Transkription und Translation wie Promotoren und Ribosomenbindungsstellen oder für Replikation oder Integration notwendige Sequenzen zu verstehen.

35 Die erfindungsgemäßen Proteine eignen sich besonders zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen, insbesondere zur Auffindung von Transketolase spezifischen Hemmstoffen.

Dazu können die Proteine beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der Transketolase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes
40 machen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Herbizide, die mit einem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

45 Die Erfindung besteht außerdem in einem Verfahren zur Herstellung von Herbiziden, die eine pflanzliche Transketolase inhibieren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man bekannte chemische Verbindungen in einem oben beschriebenen Testverfahren überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen als Herbizid formuliert.

Daß die Transketolase inhibierende Eigenschaft einer Substanz allein nicht ausreicht für die Eignung als Herbizid, sondern noch weitere Prüfungen durchzuführen sind, ist jedem Fachmann geläufig.

50 Das Verfahren gestattet es jedoch reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht.

55

Beispiele

A. Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen B zugrundeliegen:

- 5 1. Allgemeine Klonierungsverfahren
Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt. Transformation und Anzucht von Pichia pastoris wurde entsprechend den Angaben der
10 Vertreiberfirma (Invitrogen Corporation) durchgeführt. Die Transformation von Agrobacterium tumefaciens wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB Medium (Verviet et al. J. Gen. Virol. (1975) 26, 33).
- 15 2. Erzeugung von cDNA-Bibliotheken
Zur Herstellung von Blatt-spezifischen cDNA Bibliotheken wurde Gesamt-RNA aus Tabakblättern nach einer von Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163,21) beschriebenen Methode isoliert. Anschließend wurde die poly(A)-RNA über Oligo(dT)-Cellulose Type 7 (Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden 5 µg der so erhaltenen RNA für die cDNA Synthese eingesetzt. Alle
20 für die Herstellung der cDNA notwendigen Chemikalien und Enzyme wurden durch die Firma Stratagene (La Jolla CA 92037, USA) bezogen. Die angewandten Methoden wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Synthese des ersten und zweiten Stranges der cDNA wurde mit dem ZAP-cDNA Synthese Kit durchgeführt. Die erhaltenen doppelsträngigen cDNAs wurden anschließend mit EcoRI-NotI Adaptoren versehen und in einen EcoRI gespaltenen Lambda ZAPII Vektor kloniert. Nach in vitro Verpackung (Gigapack II Verpackungsextrakt) der rekombinanten Lambda DNA wurden XL-1 E. coli Zellen (Stratagene) transformiert. Durch Auszählen der gebildeten Plaques wurde der Titer der cDNA-Bibliotheken bestimmt.
- 25 3. Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek mittels heterologer DNA-Sonden
2 x 10⁵ rekombinante Lambda Phagen (Lambda ZapII) einer blattspezifische cDNA-Bibliothek aus Tabak (Varietät Samsun NN) wurden auf Agarplatten ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nylon-Membranen (Hybond N, Amersham Buchler) transferiert und durch Inkubation für 2 Stunden bei 80°C auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonden dienten DNA-Fragmente, die mit Hilfe eines "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von α-³²P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurden. Hybridisierung der Membran erfolgte nach Prähybridisierung bei 42°C in PEG-Puffer (Amasino (1986) Anal. Biochem. 152, 304-307) für 12-16 Stunden. Anschließend wurden die Filter 3 x 20 Minuten in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 42°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gereinigt.
- 30 4. Sequenzanalyse rekombinanter DNA
Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem automatischen Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer (A.L.F.) der Firma Pharmacia unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Oligonukleotide nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467).
- 40 5. Bakterienstämme und Hefestämme
E. coli (XL-1 Blue) Bakterien wurden von der Firma Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation eingesetzte Agrobacterium tumefaciens Stamm (C58Cl mit dem Plasmid pGV 3850kan) wurde von Debleare et al. (1985, Nucl. Acid Res. 13, 4777) beschrieben. Pichia pastoris Stamm GS115 wurde von der Firma Invitrogen Corporation (San Diego, CA 92121, USA) bezogen.
- 50 6. Tabaktransformation
Zur Transformation von Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum L. cv. Samsun NN) wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von Agrobacterium tumefaciens abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien im gleichen Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden
55 Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakterienlösung gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant. (1962) 15,473) mit 2 % Saccharose und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Claforan, 1 mg/ml Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphthylthylsäure (NAA), 1,6 % Glukose und 0,8 % Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht/8 Stunden

Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt.

7. Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben

5 Gesamt RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163,21) beschrieben isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20-40 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA Moleküle wurde die RNA mittels Kapillarttransfer auf eine Nylon Membran übertragen. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino (Anal. Biochem. (1986) 152, 304) beschrieben durchgeführt. Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem Ran-

10 dom Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) radioaktiv markiert.

8. PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren

Die PCR-Amplifikation der Transketolase zur Expression des Enzyms in *E. coli* und *Pichia* wurde in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Reaktionsgemische enthielten 1 ng Template, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 0,25 mM Nukleotide (Pharmacia), Amplifikationspuffer (16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C), 0,01 % Tween

15 20, 7,5 mM MgCl₂) und 2,5 Einheiten der Tth DNA Polymerase (Biomaster, Crottorf Str. 25, 51109 Köln). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

20 Anlagerungstemperatur: 60°C
Denaturierungstemperatur: 94°C
Elongationstemperatur: 72°C
Anzahl der Zyklen: 30

9. Überexpression von Proteinen in *E. coli*

25 Zur Überexpression der Transketolase in *E. coli* wurden 2 ml einer bei 28°C angezogenen Übernachtskultur in 20 ml Wachstumsmedium (LB-Medium komplettiert mit 10 µg/ml Tetracyclin, 200 µg/ml Ampicillin, 1 mM Vitamin B1, 1 mM MgSO₄) überführt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C unter Schütteln. Nach 3 Stunden wurde die Expression der Transketolase durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Der Nachweis des produzierten Proteins wurde durch

30 Auftrennung der Proteine in einem SDS-PAAG (Laemmli (1970) Nature 227, 680-685) mit anschließender Coomassie-Färbung der Proteine durchgeführt.

B. Ausführungsbeispiele

1. Klonierung der plastidären Transketolase

35 Aus einer blattspezifischen cDNA-Bibliothek aus Tabak (Varietät Samsun NN) wurde ein Klon, der für Transketolase kodiert, ausgewählt. Die DNA Sequenz ist in SEQ ID NO 1 dargestellt.

Der 2629 Basenpaar lange cDNA-Klon 21 enthält einen offenen Leseraster von 2229 Basen und kodiert für ein Protein mit 743 Aminosäuren. Analyse des Polypeptides unter Verwendung des Sequenzprogramms PC/Gene (Untermenü TRANSPEP) ergab, daß am N-Terminus des Proteins ein chloroplastidäres Transitpeptid von vermut-

40 lich 77 Aminosäuren vorhanden ist.

2. Vergleich der plastidären Transketolase aus Tabak mit bekannten Transketolase Proteinsequenzen

45 Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Klons TK-23 (MacMolly Sequenzanalyse Programm von Macintosh) mit publizierten Transketolase-Sequenzen ergaben, daß im Bereich des vermutlich reifen Polypeptides (Aminosäure 78 bis 743) die höchsten Homologien zu Transketolasen aus *Saccharomyces cerevisiae* bestehen (Abbildung 4). Die Sequenz des reifen Proteins (bestimmt durch Computervorhersage) ist zu 47,7 % bzw. 44,1 % identisch mit der Transketolase 1 bzw. 2 Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae*. Geringere Sequenzhomologien wurden zu den übrigen Transketolasen gefunden. Keine Sequenzhomologie wurde für den Bereich

50 des Transitpeptides ermittelt.

3. Expressionsanalyse der plastidären Transketolase

Expressionsanalysen einiger am Calvin Cyclus beteiligter Enzyme (RUBISCO, FBPase) haben ergeben, daß die Akkumulation der entsprechenden Transkripte an grünes Gewebe und Licht gebunden ist. Zur Überprüfung der

55 gewebespezifischen Expression der Transketolase in Tabakpflanzen wurde Gesamt-RNA aus Sinkblättern, Sourceblättern, Blütenknospen, Stengeln (Internodien, Nodien und Mark), Wurzeln und geöffneten Blüten wachsender Tabakpflanzen isoliert. Nach Auftrennung in Agarosegelen und Bindung der RNA auf Nylonmembranen wurde die Anwesenheit Transketolase spezifischer Transkripte durch Hybridisierung mit der radioaktiven TK-23 cDNA nachgewiesen. Wie in Abbildung 5 dargestellt, sind Transketolase-spezifische Transkripte in allen getesteten

Organen nachweisbar. Dieser Befund verdeutlicht, daß im Gegensatz zu anderen Enzymen des Calvin Cyclus, die Transketolase neben ihrer Funktion im Calvin Cyclus weitere Aufgaben im pflanzlichen Stoffwechsel erfüllt.

4. Antisenseinhibierung der Transketolase in transgenen Tabakpflanzen

Um transgene Tabakpflanzen mit verminderter Transketolaseaktivität zu erzeugen, wurden die cDNA Klone TK-26 und TK-28 in Gegenrichtung mit einem konstitutiven Expression bewirkenden Promotor sowie einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Die Plasmide BinAR-anti-TK-26 und BinAR-anti-TK-28 bestehend aus den drei Fragmenten A, der jeweiligen cDNA (s. Abb. 6, TK-26 und TK-28) und C wurden durch Insertion der entsprechenden cDNA Sequenzen in den Expressionsvektor pBinAR (Abb. 7A) erzeugt.

Das Fragment A beinhaltet den 35S CaMV Promoter. Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik Virus (CaMV) umfaßt (Franck et al. (1980) Cell 21, 285). Es wurde als EcoRI-KpnI Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al. (1986) Nucleic. Acid Res. 14, 5857) isoliert. Die TK-26 cDNA wurde aus dem pBluescript SK- (Abb. 6) als XbaI-SalI Fragment und die TK-28 cDNA als BamHI Fragment in Gegenrichtung in den pBinAR Vektor kloniert (Abb. 7B und C). Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984); EMBO J. 3, 835), Nukleotide 11749-11939, welches als PvuII-HindIII Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al. (1983); Nature 303,209) isoliert worden ist und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors kloniert worden war.

Die erhaltenen Plasmide wurden mit Hilfe des Agrobacteriumsystem in Tabak transformiert. Transformierte Tabakpflanzen wurden auf Antibiotika haltigem Medium angezogen und die erfolgreiche Inhibierung der Transketolase wurde durch Bestimmung der Transkriptmenge mittels Northern Experimenten ermittelt. Für jede Transformation (TK-26 und TK-28) wurden 100 unabhängige Transformanten untersucht. In Abbildung 8 ist das Ergebnis eines Northern-Experimentes dargestellt. In den meisten regenerierten Pflanzen konnte keine Reduktion der Transketolase mRNA nachgewiesen werden. Einige der Pflanzen zeigten allerdings eine starke Verminderung der Transketolase-spezifischen Transkripte (z.B. anti-TK-26 No. 26; Abb. 8). Die Reduktion der Transkriptmenge führte zu einer Unterdrückung des Pflanzenwachstums. Transfer der Pflanzen ins Gewächshaus führte zu einem Absterben der inhibierten Pflanzen.

5. Herstellung des Plasmides TK23-AC-pQE-9

Zur Etablierung eines molekularen Testsystems wurde die pflanzliche Transketolase in mikrobiellen Systemen überexprimiert.

Zur Expression der Transketolase in E. coli wurde die TK-23 Sequenz, die für das reife Polypeptid kodiert, unter Verwendung der Primer A und C (s. Abb. 9) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert (Gentechnische Verfahren, Absatz 8). Das TK23-AC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als SalI Fragment in die SalI-Schnittstelle des Vektors pQE-9 (DIAGEN GmbH, QLAGEN Inc.) kloniert (Abb. 10).

6. Herstellung des Plasmides TK23-AC-pPIC-9 und TK23-BC-pHIL-D2

Da eukaryontische Enzyme häufig nur unzureichend in bakteriellen Systemen exprimiert werden können, wurden zwei weitere Plasmidkonstruktionen durchgeführt, die eine Expression in Pichia pastoris (Stamm GS115; Firma Invitrogen Corporation San Diego, CA 92121, USA) ermöglichen.

Zur Sekretion des Transketolase Proteins wurde das Plasmid TK23-AC-pPIC-9 konstruiert. Zur Fusion des Transketolase Proteins mit einem Hefe Signalpeptid wurde ein Teil der TK-23 Sequenz, der für das reife Polypeptid kodiert, unter Verwendung der Primer A und C (s. Abb. 9) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert (Gentechnische Verfahren, Absatz 8). Das TK23-AC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als EcoRI-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pPIC-9 des Pichia Expressions Kit (Invitrogen) kloniert (Abb. 11). Um eine intrazelluläre Akkumulation des Transketolase Enzyms zu gewährleisten wurde das Plasmid TK23-BC-pHIL-D2 hergestellt. Zur besseren Aufreinigung des Enzyms wurde ein 5'-PCR Primer (s. Abb. 9) zur Amplifikation der Transketolase verwendet, der ein Startkodon für die Translation enthält und für sechs Histidinreste kodiert. Nach PCR-Amplifikation der in Abbildung 9 angegebenen TK-23 Sequenz wurde das TK-23-BC-Produkt in den Vektor pGEM-T kloniert. Das TK23-BC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als EcoRI-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pHIL-D2 des Pichia Expressions Kit (Invitrogen) kloniert (Abb. 12).

7. Expression der pflanzlichen Transketolase in E. coli

Zur Überexpression der Transketolase in E. coli wurden 2 ml LB-Medium mit XL-1 E-coli Zellen beimpft, die das Plasmid TK23-AC-pQU-9 enthielten. Die Kulturen wurden über Nacht bei 28°C in Anwesenheit von Antibiotika und unter Schütteln angezogen. Anschließend wurden die Übernachtskulturen in 20 ml Wachstumsmedium (LB-Medium komplettiert mit: 10 µg/ml Tetracyclin, 200 µg/ml Ampicillin, 1 mM Vitamin B1, 1mM MgSO₄) überführt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C unter Schütteln. Nach 3 Stunden wurde die Expression der Transketolase durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Der Nachweis des produzierten Proteins wurde durch Auftrennung der Proteine

in einem SDS-PAAG (Laemmli (1970) Nature 227, 680-685) mit anschließender Coomassie-Färbung der Proteine durchgeführt. Als Kontrollen dienten Kulturen, die entweder nicht mit IPTG induziert wurden, oder Kulturen, die die Transketolase in Gegensinnorientierung enthielten. Das Ergebnis eines Induktions-Experimentes ist in Abbildung 13 dargestellt. Ein Protein der entsprechenden Größe akkumulierte in Bakterienkulturen, die mit IPTG induziert wurden und das Plasmid TK23-AC-pQE-9 enthielten. Die Akkumulation beginnt eine Stunde nach Induktion. In den Kontrollen (ohne IPTG bzw. Transketolase in Gegensinnorientierung) ist kein vergleichbares Protein identifizierbar.

Abbildungen

1. Reduktiver Pentosephosphatzyklus
2. Verknüpfung des Pentosephosphatzyklus mit anderen Stoffwechselwegen
3. Nukleotidsequenz der plastidären Transketolase aus Tabak
4. Aminosäurevergleich der plastidären Transketolase mit Transketolase 1 und 2 aus Hefe
5. Nachweis der Transketolase mRNA in unterschiedlichen Tabakgeweben
6. Schematische Darstellung der Transketolase cDNA-Klone
7. Schematische Darstellung der Plasmide BinAR-TK-26-anti und BinAR-TK-28-anu
8. Northernanalyse transgener Tabakpflanzen
9. Strategie und Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation der plastidären Transketolase
10. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-AC-pQE-9
11. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-AC-pPIC-9
12. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-BC-pHIL-D2
13. Überexpression der pflanzlichen Transketolase in E. coli

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

10

(A) NAME: BASF Aktiengesellschaft

(B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38

15

(C) ORT: Ludwigshafen

(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: D-67056

20

(G) TELEPHON: 0621/6048526

(H) TELEFAX: 0621/6043123

25

(I) TELEX: 1762175170

(ii) ANMELDETITEL: Transketolase aus Pflanzen

30

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

35

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

40

(A) LÄNGE: 2629 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Nicotiana

(ix) MERKMALE:

50

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 60..2289

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

55

EP 0 723 017 A2

| | | |
|----|---|-----|
| | CTCCTCTTCA CTCTCTTTTC TCTTTGAGAC AAAACATCAA ACACCTTACT GGTAAGCC | 59 |
| | ATG GCG TCT TCT TCT TCT CTC ACT CTC TCT CAA GCT ATC CTC TCT CGT | 107 |
| 5 | Met Ala Ser Ser Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gln Ala Ile Leu Ser Arg | |
| | 1 5 10 15 | |
| | TCT GTC CCT CGC CAT GGC TCT GCC TCT TCT TCT CAA CTT TCC CCT TCT | 155 |
| | Ser Val Pro Arg His Gly Ser Ala Ser Ser Ser Gln Leu Ser Pro Ser | |
| | 20 25 30 | |
| 10 | TCT CTC ACT TTT TCC GGC CTT AAA TCC AAT CCC AAT ATC ACC ACC TCC | 203 |
| | Ser Leu Thr Phe Ser Gly Leu Lys Ser Asn Pro Asn Ile Thr Thr Ser | |
| | 35 40 45 | |
| | CGC CGC CGT ACT CCT TCC TCC GCC GCC GCC GCC GTC GTA AGG TCA | 251 |
| 15 | Arg Arg Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Ser | |
| | 50 55 60 | |
| | CCG GCG ATT CGT GCC TCA GCT GCA ACC GAA ACC ATA GAG AAA ACT GAG | 299 |
| | Pro Ala Ile Arg Ala Ser Ala Ala Thr Glu Thr Ile Glu Lys Thr Glu | |
| | 65 70 75 80 | |
| 20 | ACT GCG CTT GTT GAC AAA TCT GTA AAC ACG ATT CGA TTT TTG GCT ATT | 347 |
| | Thr Ala Leu Val Asp Lys Ser Val Asn Thr Ile Arg Phe Leu Ala Ile | |
| | 85 90 95 | |
| | GAT GCT GTT GAA AGG CAA ATT CGG GTC ACC CGG TTT GCC ATG GGT TGT | 395 |
| 25 | Asp Ala Val Glu Arg Gln Ile Arg Val Thr Arg Phe Ala Met Gly Cys | |
| | 100 105 110 | |
| | GCT CCG ATG GGT CAT ATA TTG TAC GAT GAG GTT ATG AGG TAT AAC CCG | 443 |
| | Ala Pro Met Gly His Ile Leu Tyr Asp Glu Val Met Arg Tyr Asn Pro | |
| | 115 120 125 | |
| 30 | AAA AAC CCG TAT TGG TTT AAT CGG GAT CGG TTT GTT CTA TCA GCT GGA | 491 |
| | Lys Asn Pro Tyr Trp Phe Asn Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Ala Gly | |
| | 130 135 140 | |
| | CAT GGT TGT ATG CTT CAG TAT GCT TTG CTT CAT CTA GCT GGC TAT GAT | 539 |
| 35 | His Gly Cys Met Leu Gln Tyr Ala Leu Leu His Leu Ala Gly Tyr Asp | |
| | 145 150 155 160 | |
| | GCT GTC AGG GAA GAG GAC TTG AAG AGC TTC CGT CAG TGG GGA ACC AAA | 587 |
| | Ala Val Arg Glu Glu Asp Leu Lys Ser Phe Arg Gln Trp Gly Thr Lys | |
| | 165 170 175 | |
| 40 | ACC CCT GGA CAC CCT GAA AAC TTT GAG ACA CCT GGT GTT GAA GTC ACC | 635 |
| | Thr Pro Gly His Pro Glu Asn Phe Glu Thr Pro Gly Val Glu Val Thr | |
| | 180 185 190 | |
| | ACC GGG CCT CTG GGA CAA GGT ATT GCC AAC GCC GTT GGC TTG GCT CTT | 683 |
| 45 | Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Leu Ala Leu | |
| | 195 200 205 | |
| | GTG GAG AAA CAC TTG GCT GCT CGT TTC AAT AAG CCT GAC GCT GAG ATT | 731 |
| | Val Glu Lys His Leu Ala Ala Arg Phe Asn Lys Pro Asp Ala Glu Ile | |
| | 210 215 220 | |
| 50 | GTA GAC CAC TAC ACA TAT GTT ATT CTC GGT GAT GGT TGC CAG ATG GAG | 779 |
| | Val Asp His Tyr Thr Tyr Val Ile Leu Gly Asp Gly Cys Gln Met Glu | |
| | 225 230 235 240 | |

55

EP 0 723 017 A2

| | | |
|----|---|------|
| | GGT ATT TCA CAA GAA GCT TGT TCC CTT GCT GGA CAC TGG GGA CTT GGA | 827 |
| | Gly Ile Ser Gln Glu Ala Cys Ser Leu Ala Gly His Trp Gly Leu Gly | |
| | 245 250 255 | |
| 5 | AAG CTG ATT GCT TTC TAT GAT GAC AAC CAC ATC TCA ATT GAT GGT GAC | 875 |
| | Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asp Asn His Ile Ser Ile Asp Gly Asp | |
| | 260 265 270 | |
| | ACA GAA ATC GCT TTC ACT GAG GAT GTT GGT GCC CGT TTT GAG GCT CTT | 923 |
| 10 | Thr Glu Ile Ala Phe Thr Glu Asp Val Gly Ala Arg Phe Glu Ala Leu | |
| | 275 280 285 | |
| | GGG TGG CAC GTA ATC TGG GTG AAG AAC GGT AAC ACT GGT TAT GAT GAG | 971 |
| | Gly Trp His Val Ile Trp Val Lys Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asp Glu | |
| | 290 295 300 | |
| 15 | ATT CGT GCT GCT ATT AAG GAA GCA AAA ACT GTC ACA GAC AAA CCC ACT | 1019 |
| | Ile Arg Ala Ala Ile Lys Glu Ala Lys Thr Val Thr Asp Lys Pro Thr | |
| | 305 310 315 320 | |
| | ATG ATC AAG GTG ACT ACA ACC ATT GGT TTT GGC TCG CCC AAC AAG GCA | 1067 |
| 20 | Met Ile Lys Val Thr Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala | |
| | 325 330 335 | |
| | AAC AGT TAC AGT GTA CAT GGA AGT GCA CTT GGA GCT AAG GAA GTA GAG | 1115 |
| | Asn Ser Tyr Ser Val His Gly Ser Ala Leu Gly Ala Lys Glu Val Glu | |
| | 340 345 350 | |
| 25 | GCC ACC AGG AGT AAC TTG GGA TGG CCT TAT GAG CCT TTC CAT GTG CCT | 1163 |
| | Ala Thr Arg Ser Asn Leu Gly Trp Pro Tyr Glu Pro Phe His Val Pro | |
| | 355 360 365 | |
| | GAA GAT GTC AAG AGC CAT TGG AGT CGT CAT GTT CCC GAG GGT GCT GCT | 1211 |
| 30 | Glu Asp Val Lys Ser His Trp Ser Arg His Val Pro Glu Gly Ala Ala | |
| | 370 375 380 | |
| | CTT GAA GCT GGG TGG AAT ACC AAG TTT GCT GAA TAT GAG AAG AAG TAC | 1259 |
| | Leu Glu Ala Gly Trp Asn Thr Lys Phe Ala Glu Tyr Glu Lys Lys Tyr | |
| | 385 390 395 400 | |
| 35 | CCA GAG GAA GCT GCA GAA CTC AAA TCC ATT ACT ACT GGT GAA CTA CCT | 1307 |
| | Pro Glu Glu Ala Ala Glu Leu Lys Ser Ile Thr Thr Gly Glu Leu Pro | |
| | 405 410 415 | |
| | GCT GGC TGG GAG AAA GCT CTT CCT ACC TAC ACA CCT GAA AGT CCA GCG | 1355 |
| 40 | Ala Gly Trp Glu Lys Ala Leu Pro Thr Tyr Thr Pro Glu Ser Pro Ala | |
| | 420 425 430 | |
| | GAT GCC ACC AGA AAC CTG TCC CAA CAA AAC CTG AAT GCT CTT GCC AAG | 1403 |
| | Asp Ala Thr Arg Asn Leu Ser Gln Gln Asn Leu Asn Ala Leu Ala Lys | |
| | 435 440 445 | |
| 45 | GTT CTT CCT GGT TTC CTT GGT GGT AGT GCT GAT CTT GCC TCA TCA AAC | 1451 |
| | Val Leu Pro Gly Phe Leu Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Ser Ser Asn | |
| | 450 455 460 | |
| | ATG ACC CTC ATG AAA ATG TTT GGT GAC TTC CAA AAG AAC ACC CCA GAG | 1499 |
| 50 | Met Thr Leu Met Lys Met Phe Gly Asp Phe Gln Lys Asn Thr Pro Glu | |
| | 465 470 475 480 | |

55

EP 0 723 017 A2

| | | |
|----|---|------|
| | GAG CGT AAT CTA AGG TTT GGT GTT CGT GAA CAT GGT ATG GGA GCC ATA | 1547 |
| | Glu Arg Asn Leu Arg Phe Gly Val Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile | |
| | 485 490 495 | |
| 5 | TGT AAT GGT AAT GCT CTA CAC AGC CCT GGC TTG ATT CCC TAC TGT GCT | 1595 |
| | Cys Asn Gly Asn Ala Leu His Ser Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Cys Ala | |
| | 500 505 510 | |
| | ACT TTC TTT GTG TTC ACC GAC TAC ATG AGA GGA GCT ATG AGA ATT TCA | 1643 |
| 10 | Thr Phe Phe Val Phe Thr Asp Tyr Met Arg Gly Ala Met Arg Ile Ser | |
| | 515 520 525 | |
| | GCC TTG TCT GAG GCT GGA GTT ATT TAT GTT ATG ACC CAC GAT TCA ATT | 1691 |
| | Ala Leu Ser Glu Ala Gly Val Ile Tyr Val Met Thr His Asp Ser Ile | |
| | 530 535 540 | |
| 15 | GGT CTA GGA GAA GAT GGG CCT ACC CAT CAA CCC ATT GAG CAC TTG CCA | 1739 |
| | Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Ile Glu His Leu Pro | |
| | 545 550 555 560 | |
| | AGT TTC CGT GCA ATG CCC AAC ATT CTG ATG TTC CGT CCA GCA GAT GGC | 1787 |
| 20 | Ser Phe Arg Ala Met Pro Asn Ile Leu Met Phe Arg Pro Ala Asp Gly | |
| | 565 570 575 | |
| | AAG GAG ACA GCG GGA GCT TAC AAG GTG GCT GTC CTC AAG AGG AAG ACA | 1835 |
| | Lys Glu Thr Ala Gly Ala Tyr Lys Val Ala Val Leu Lys Arg Lys Thr | |
| | 580 585 590 | |
| 25 | CCA TCA ATC CTT GCC CTC TCT CGG CAA AAG TTG CCA CAA CTT GCT GGA | 1883 |
| | Pro Ser Ile Leu Ala Leu Ser Arg Gln Lys Leu Pro Gln Leu Ala Gly | |
| | 595 600 605 | |
| | AGT TCT ATT GAA GGA GCA GCA AAG CGT GGC TAC ATT TTA TCA GAC AAT | 1931 |
| 30 | Ser Ser Ile Glu Gly Ala Ala Lys Arg Gly Tyr Ile Leu Ser Asp Asn | |
| | 610 615 620 | |
| | TCT TCT GGC AAC AAA CCT GAT GTC ATT TTG ATT GGT ACT GGC TCA GAG | 1979 |
| | Ser Ser Gly Asn Lys Pro Asp Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Ser Glu | |
| | 625 630 635 640 | |
| 35 | TTA GAA ATT GCT GTC AAG GCT GCT GAT GAA CTC AGG AAA GAA GGA AAA | 2027 |
| | Leu Glu Ile Ala Val Lys Ala Ala Asp Glu Leu Arg Lys Glu Gly Lys | |
| | 645 650 655 | |
| | GCA GTG AGA GTT GTT TCC TTT GTT TGT TGG GAG CTT TTT GAA GAA CAA | 2075 |
| 40 | Ala Val Arg Val Val Ser Phe Val Cys Trp Glu Leu Phe Glu Glu Gln | |
| | 660 665 670 | |
| | TCA GCC GAC TAC AAG GAA AGT GTC CTT CCA TCA TCT GTT ACA GCT AGA | 2123 |
| | Ser Ala Asp Tyr Lys Glu Ser Val Leu Pro Ser Ser Val Thr Ala Arg | |
| | 675 680 685 | |
| 45 | GTT AGC ATT GAG GCC GGA TCC ACA TTT GGG TGG GAG AAA TAT GTC GGA | 2171 |
| | Val Ser Ile Glu Ala Gly Ser Thr Phe Gly Trp Glu Lys Tyr Val Gly | |
| | 690 695 700 | |
| | TCA AAG GGG AAG GCC ATC GGA ATT GAC AGA TGG GGT GCC AGT GCC CCT | 2219 |
| 50 | Ser Lys Gly Lys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Trp Gly Ala Ser Ala Pro | |
| | 705 710 715 720 | |

55

GCT GGA AAA ATA TAC AAG GAG TAC GGA ATT ACA GCA GAG GCT GTT GTA 2267
 Ala Gly Lys Ile Tyr Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Ala Glu Ala Val Val
 5 725 730 735
 GCT GCA GCT AAA CAA GTT TCT T AGGCTTTATT ACTTACCCTT GGTGCTGGT 2319
 Ala Ala Ala Lys Gln Val Ser
 740
 GTCTACCAAA TTTGTTTCA TTTTGAACT GAGGTTGGAG ATAACGGTGG AAACCAATAC 2379
 10 CAAACGGACT CGGCAGTTCA CTGTTGCCCTG GTATTTTCAA TAAAACTAT TTCTTCATCT 2439
 GTCCTTTGTT TTCTTCAGTT TTAGTAGCGG AGCGGCCAAA ATGAATCCAA GATGAGGATA 2499
 GAAATAGGAT TATGGATGCT CCTGACCATG TACACTTAAA ACATATCTGT GAGTTTTGTA 2559
 ATTTTATTTG GTCGAGTGAT ACCAAGATCT CATTTTCAAT TGGAAAAAAA AAAAAAAAAA 2619
 15 AAAAAAAAAA 2629
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:
 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 743 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 20 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:
 25 Met Ala Ser Ser Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gln Ala Ile Leu Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Pro Arg His Gly Ser Ala Ser Ser Ser Gln Leu Ser Pro Ser
 20 25 30
 Ser Leu Thr Phe Ser Gly Leu Lys Ser Asn Pro Asn Ile Thr Thr Ser
 30 35 40 45
 Arg Arg Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Ser
 50 55 60
 Pro Ala Ile Arg Ala Ser Ala Ala Thr Glu Thr Ile Glu Lys Thr Glu
 65 70 75 80
 35 Thr Ala Leu Val Asp Lys Ser Val Asn Thr Ile Arg Phe Leu Ala Ile
 85 90 95
 Asp Ala Val Glu Arg Gln Ile Arg Val Thr Arg Phe Ala Met Gly Cys
 100 105 110
 40 Ala Pro Met Gly His Ile Leu Tyr Asp Glu Val Met Arg Tyr Asn Pro
 115 120 125
 Lys Asn Pro Tyr Trp Phe Asn Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Ala Gly
 130 135 140
 45 His Gly Cys Met Leu Gln Tyr Ala Leu Leu His Leu Ala Gly Tyr Asp
 145 150 155 160
 Ala Val Arg Glu Glu Asp Leu Lys Ser Phe Arg Gln Trp Gly Thr Lys
 165 170 175
 Thr Pro Gly His Pro Glu Asn Phe Glu Thr Pro Gly Val Glu Val Thr
 180 185 190
 50 Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Leu Ala Leu
 195 200 205

55

EP 0 723 017 A2

Val Glu Lys His Leu Ala Ala Arg Phe Asn Lys Pro Asp Ala Glu Ile
210 215 220

5 Val Asp His Tyr Thr Tyr Val Ile Leu Gly Asp Gly Cys Gln Met Glu
225 230 235 240
Gly Ile Ser Gln Glu Ala Cys Ser Leu Ala Gly His Trp Gly Leu Gly
245 250 255

10 Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asp Asn His Ile Ser Ile Asp Gly Asp
260 265 270
Thr Glu Ile Ala Phe Thr Glu Asp Val Gly Ala Arg Phe Glu Ala Leu
275 280 285

15 Gly Trp His Val Ile Trp Val Lys Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asp Glu
290 295 300
Ile Arg Ala Ala Ile Lys Glu Ala Lys Thr Val Thr Asp Lys Pro Thr
305 310 315 320
Met Ile Lys Val Thr Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala
325 330 335

20 Asn Ser Tyr Ser Val His Gly Ser Ala Leu Gly Ala Lys Glu Val Glu
340 345 350
Ala Thr Arg Ser Asn Leu Gly Trp Pro Tyr Glu Pro Phe His Val Pro
355 360 365

25 Glu Asp Val Lys Ser His Trp Ser Arg His Val Pro Glu Gly Ala Ala
370 375 380
Leu Glu Ala Gly Trp Asn Thr Lys Phe Ala Glu Tyr Glu Lys Lys Tyr
385 390 395 400
Pro Glu Glu Ala Ala Glu Leu Lys Ser Ile Thr Thr Gly Glu Leu Pro
405 410 415

30 Ala Gly Trp Glu Lys Ala Leu Pro Thr Tyr Thr Pro Glu Ser Pro Ala
420 425 430
Asp Ala Thr Arg Asn Leu Ser Gln Gln Asn Leu Asn Ala Leu Ala Lys
435 440 445

35 Val Leu Pro Gly Phe Leu Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Ser Ser Asn
450 455 460
Met Thr Leu Met Lys Met Phe Gly Asp Phe Gln Lys Asn Thr Pro Glu
465 470 475 480

40 Glu Arg Asn Leu Arg Phe Gly Val Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile
485 490 495
Cys Asn Gly Asn Ala Leu His Ser Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Cys Ala
500 505 510

45 Thr Phe Phe Val Phe Thr Asp Tyr Met Arg Gly Ala Met Arg Ile Ser
515 520 525
Ala Leu Ser Glu Ala Gly Val Ile Tyr Val Met Thr His Asp Ser Ile
530 535 540

50 Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Ile Glu His Leu Pro
545 550 555 560
Ser Phe Arg Ala Met Pro Asn Ile Leu Met Phe Arg Pro Ala Asp Gly
565 570 575

55

Lys Glu Thr Ala Gly Ala Tyr Lys Val Ala Val Leu Lys Arg Lys Thr
 580 585 590
 5 Pro Ser Ile Leu Ala Leu Ser Arg Gln Lys Leu Pro Gln Leu Ala Gly
 595 600 605
 Ser Ser Ile Glu Gly Ala Ala Lys Arg Gly Tyr Ile Leu Ser Asp Asn
 610 615 620
 10 Ser Ser Gly Asn Lys Pro Asp Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Ser Glu
 625 630 635 640
 Leu Glu Ile Ala Val Lys Ala Ala Asp Glu Leu Arg Lys Glu Gly Lys
 645 650 655
 15 Ala Val Arg Val Val Ser Phe Val Cys Trp Glu Leu Phe Glu Glu Gln
 660 665 670
 Ser Ala Asp Tyr Lys Glu Ser Val Leu Pro Ser Ser Val Thr Ala Arg
 675 680 685
 20 Val Ser Ile Glu Ala Gly Ser Thr Phe Gly Trp Glu Lys Tyr Val Gly
 690 695 700
 Ser Lys Gly Lys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Trp Gly Ala Ser Ala Pro
 705 710 715 720
 25 Ala Gly Lys Ile Tyr Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Ala Glu Ala Val Val
 725 730 735
 Ala Ala Ala Lys Gln Val Ser
 740

30

Patentansprüche

35

1. Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 darstellt.

40

2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 78-743 aus SEQ ID NO 2 enthält.

3. Protein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ ID NO 2 dargestellte Sequenz enthält.

45

4. Nukleinsäure, codierend für ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1-3.

5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus der in SEQ ID NO 1 dargestellten Sequenz besteht.

50

6. Vektoren, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 4 oder 5 zusammen mit funktionellen Regulationssignalen.

7. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1-3 zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen.

55

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung mittels eines in vitro Testsystems erfolgt.

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Testsystem ein Enzymhemmtest eingesetzt wird.

10. Testsystem zur Identifizierung von Transketolase-Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß man die potentiellen Inhibitoren mit einem Protein gemäß Anspruch 1-3 inkubiert und anschließend die Transketolase Aktivität bestimmt.

5 11. Herbizide Wirkstoffe, identifizierbar mittels eines Testsystems gemäß Anspruch 10.

12. Verfahren zur Herstellung von Herbiziden, die eine pflanzliche Transketolase inhibieren, dadurch gekennzeichnet, daß man bekanntechemische Verbindungen in einem Testverfahren gemäß Anspruch 10 überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen als Herbizid formuliert.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

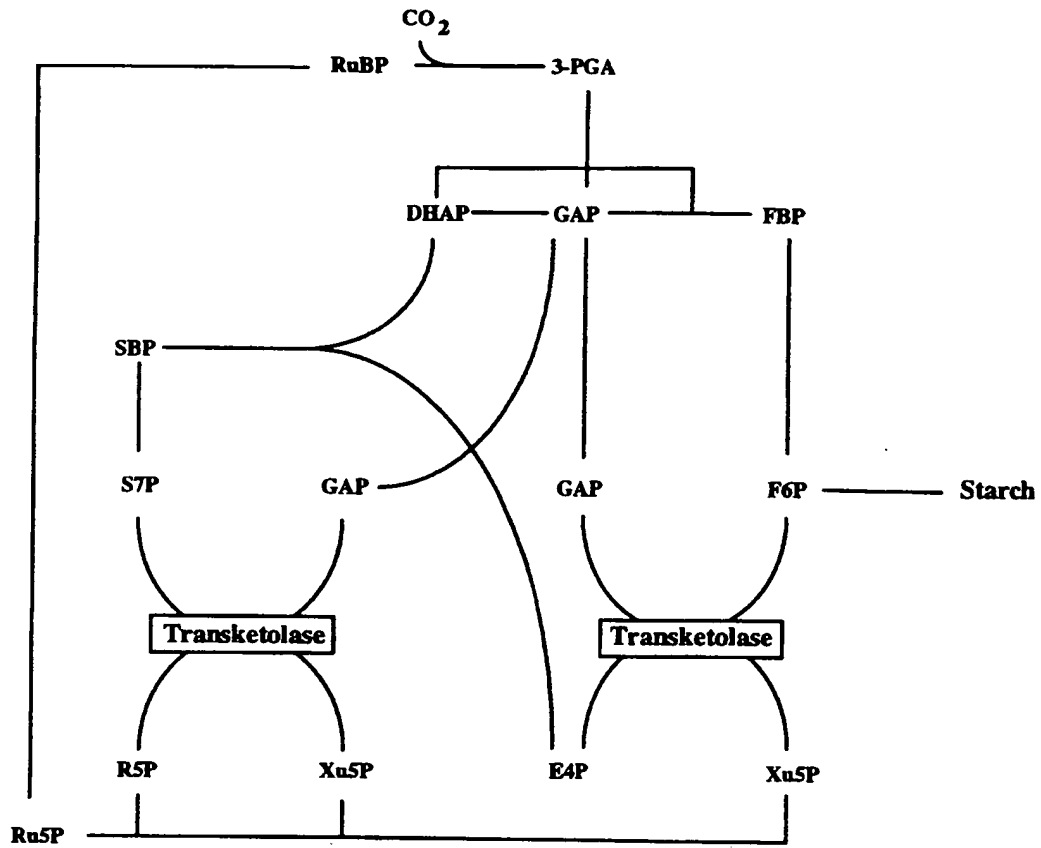


Abbildung 1

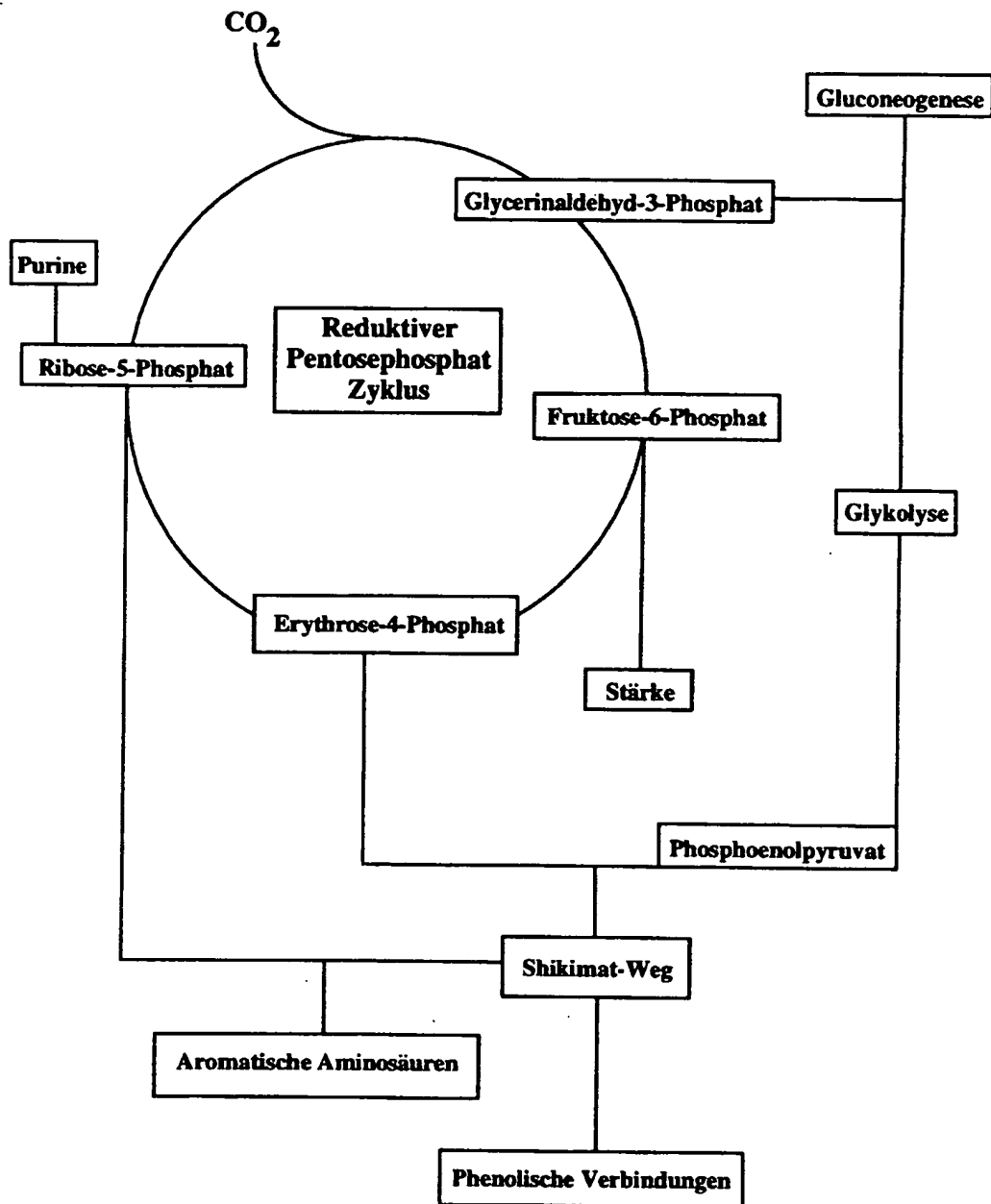


Abbildung 2

| | | | | | | |
|------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| 1 | CTCCTCTTCA | CTCTCTTTTC | TCTTTGAGAC | AAAACATCAA | ACACCTTACT | 50 |
| 51 | GGTAAAGCCA | TGGCGTCTTC | TTCTTCTCTC | ACTCTCTCTC | AAGCTATCCT | 100 |
| 101 | CTCTCGTTCT | GTCCCTCGCC | ATGGCTCTGC | CTCTTCTTCT | CAACTTTCCC | 150 |
| 151 | CTTCTTCTCT | CACTTTTTTC | GGCCTTAAAT | CCAATCCCAA | TATCACCACC | 200 |
| 201 | TCCCGCCGCC | GTACTCCTTC | CTCCGCCGCC | GCCGCCGCCG | TCGTAAGGTC | 250 |
| 251 | ACCGGCGATT | CGTGCCTCAG | CTGCAACCGA | AACCATAGAG | AAAACTGAGA | 300 |
| 301 | CTGCGCTTGT | TGACAAATCT | GTAACACAGA | TTGATTTTTT | GGCTATTGAT | 350 |
| 351 | GCTGTTGAAA | GGCAAATTCT | GGTCACCCGG | TTTGCCATGG | GTTGTGCTCC | 400 |
| 401 | GATGGGTCAT | ATATTGTACG | ATGAGGTTAT | GAGGTATAAC | CCGAAAAACC | 450 |
| 451 | CGTATTGGTT | TAATCGGGAT | CGGTTTGTTC | TATCAGCTGG | ACATGGTTGT | 500 |
| 501 | ATGCTTCAGT | ATGCTTTGCT | TCATCTAGCT | GGCTATGATG | CTGTCAGGGA | 550 |
| 551 | AGAGGACTTG | AAGAGCTTCC | GTCAGTGGGG | AAGCAAAACC | CCTGGACACC | 600 |
| 601 | CTGAAAACTT | TGAGACACCT | GGTGTGGAAG | TCACCACCGG | GCCTCTGGGA | 650 |
| 651 | CAAGGTATTG | CCAACGCCGT | TGGCTTGGCT | CTTGTGGAGA | AACACTTGCC | 700 |
| 701 | TGCTCGTTTC | AATAAGCCTG | ACGCTGAGAT | TGTAGACCAC | TACACATTG | 750 |
| 751 | TTATTCTCGG | TGATGGTTGC | CAGATGGAGG | GTATTTTACA | AGAAGCTTGT | 800 |
| 801 | TCCCTTGCTG | GACACTGGGG | ACTTGGAAG | CTGATTGCTT | TCTATGATGA | 850 |
| 851 | CAACCACATC | TCAATTGATG | GTGACACAGA | AATCGCTTTC | ACTGAGGATG | 900 |
| 901 | TTGGTGCCCG | TTTTGAGGCT | CTTGGGTGGC | ACGTAATCTG | GGTGAAGAAC | 950 |
| 951 | GGTAACACTG | GTTATGATGA | GATTCTGTGCT | GCTATTAAGG | AAGCAAAAAC | 1000 |
| 1001 | TGTCACAGAC | AAACCCACTA | TGATCAAGGT | GACTACAACC | ATTGGTTTTG | 1050 |
| 1051 | GCTCGCCCAA | CAAGGCAAA | AGTTAGAGTG | TACATGGAAG | TGCACTTGA | 1100 |
| 1101 | GCTAAGGAAG | TAGAGGCCAC | CAGGAGTAAC | TTGGGATGGC | CTTATGAGCC | 1150 |
| 1151 | TTTCCATGTG | CCTGAAGATG | TCAAGAGCCA | TTGGAGTCGT | CATGTTCCCG | 1200 |
| 1201 | AGGGTGCTGC | TCTTGAAGCT | GGGTGGAATA | CCAAGTTTGC | TGAATATGAG | 1250 |
| 1251 | AAGAAGTACC | CAGAGGAAGC | TGCAGAACTC | AAATCCATTA | CTACTGGTGA | 1300 |
| 1301 | ACTACCTGCT | GGCTGGGAGA | AAGCTCTTCC | TACCTACACA | CCTGAAAGTC | 1350 |
| 1351 | CAGCGGATGC | CACCAGAAAC | CTGTCCCAAC | AAAACCTGAA | TGCTCTTGCC | 1400 |
| 1401 | AAGGTTCTTC | CTGGTTTCCT | TGGTGGTAGT | GCTGATCTTG | CCTCATCAAA | 1450 |
| 1451 | CATGACCCTC | ATGAAAATGT | TTGGTGACTT | CCAAAAGAAC | ACCCAGAGG | 1500 |
| 1501 | AGCGTAATCT | AAGGTTTGGT | GTTTCGTGAAC | ATGGTATGGG | AGCCATATGT | 1550 |
| 1551 | AATGGTAATG | CTCTACACAG | CCCTGGCTTG | ATTCCCTACT | GTGCTACTTT | 1600 |
| 1601 | CTTTGTGTTT | ACCGACTACA | TGAGAGGAGC | TATGAGAATT | TCAGCCTTGT | 1650 |
| 1651 | CTGAGGCTGG | AGTTATTTAT | GTTATGACCC | ACGATTCAAT | TGGTCTAGGA | 1700 |
| 1701 | GAAGATGGGC | CTACCCATCA | ACCCATTGAG | CACTTGCCAA | GTTTCCGTGC | 1750 |
| 1751 | AATGCCCAAC | ATTCTGATGT | TCCGTCCAGC | AGATGGCAAG | GAGACAGCGG | 1800 |
| 1801 | GAGCTTACAA | GGTGGCTGTC | CTCAAGAGGA | AGACACCATC | AATCCTTGCC | 1850 |
| 1851 | CTCTCTCGGC | AAAAGTTGCC | ACAACCTTGCT | GGAAGTTCTA | TTGAAGGAGC | 1900 |
| 1901 | AGCAAAGGGT | GGCTACATTT | TATCAGACAA | TTCTTCTGGC | AACAAACCTG | 1950 |
| 1951 | ATGTCATTTT | GATTGGTACT | GGCTCAGAGT | TAGAAATTGC | TGTCAAGGCT | 2000 |
| 2001 | GCTGATGAAC | TCAGGAAAGA | AGGAAAAGCA | GTGAGAGTTG | TTTCCTTTGT | 2050 |
| 2051 | TTGTTGGGAG | CTTTTTGAAG | AACAATCAGC | CGACTACAAG | GAAAGTGTC | 2100 |
| 2101 | TTCCATCATC | TGTTACAGCT | AGAGTTAGCA | TTGAGGCCGG | ATCCACATTT | 2150 |
| 2151 | GGGTGGGAGA | AATATGTCGG | ATCAAAGGGG | AAGGCCATCG | GAATTGACAG | 2200 |
| 2201 | ATGGGGTGCC | AGTGCCCTTG | CTGGAAAAAT | ATACAAGGAG | TACGGAATTA | 2250 |
| 2251 | CAGCAGAGGC | TGTTGTAGCT | GCAGCTAAAC | AAGTTTCTTA | GGCTTTATTA | 2300 |
| 2301 | CTTACCCTTG | GTTGCTGGTG | TCTACCAAAT | TTGTTTTCAT | TTTGAAACTG | 2350 |
| 2351 | AGGTTGGAGA | TAACGGTGGA | AACCAATACC | AAACGGACTC | GGCAGTTCAC | 2400 |
| 2401 | TGTTGCCTGG | TATTTTCAAT | AAAAACTATT | TCTTCATCTG | TCCTTTGTTT | 2450 |
| 2451 | CTTCAGTTT | TAGTAGCGGA | GCGGCCAAAA | TGAATCCAAG | ATGAGGATAG | 2500 |
| 2501 | AAATAGGATT | ATGGATGCTC | CTGACCATGT | ACACTTAAAA | CATATCTGTG | 2550 |
| 2551 | AGTTTTGTAA | TTTTATTTGG | TCGAGTGATA | CCAAGATCTC | ATTTTCAATT | 2600 |
| 2601 | GGAAAAAAA | AAAAAAA | AAAAAAA | | | 2629 |

Abbildung 3

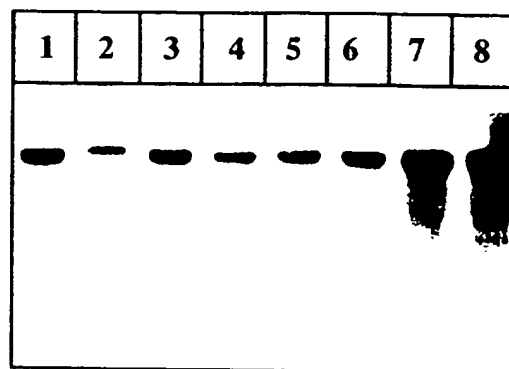
Aminosäurevergleich der plastidären Transketolase aus Tabak mit Transketolase

Isoenzymen aus *Saccharomyces carvesiae*

| | | | | | | | | | | |
|-------|-----|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|--|-------------------|-----|
| TK-23 | 1 | | | | | | | | MASSSSL TLSQAILSR | 17 |
| TK-23 | 18 | VPRHGSASSS | QLSPSSLTFS | GLKSNPNITT | SRRTTPSSAA | AAAVVRSPAI | RASAATETIE | | | 77 |
| TK-23 | 78 | KTETALVDKS | -VNTIRFLAI | DAVERQIRVT | RFAMGCAPMG | HILYDEVTRY | NPKNPYWFNR | | | 136 |
| TKL1 | 1 | M.QFTDI..L | A.S...I..V | .T.SKANS | PG.PLGMAPA | AHVLWSQ..M | ..T..D.I.. | | | 60 |
| TKL2 | 1 | MAQFSDI..L | A.S.L.L.SV | .Q..SAQSGH | PG.PLGLAPV | AHVIFKQL.C | ..N.EH.I.. | | | 60 |
| TK-23 | 137 | DRFVLSAGHG | CMLQYALLHL | AGYDAVREED | LKSPRWGSK | TPGHPENFET | PGVEVTGPL | | | 196 |
| TKL1 | 61 |N..A | VA.L.SM... | T...L-SI.. | ..Q...L..R |-..L | | | | 118 |
| TKL2 | 61 |N..S | .A.L.SM... | L...Y-SI.. | .RQ...VN.R |-..HS | A...I.S... | | | 118 |
| TK-23 | 197 | GQGIANAVGL | ALVEKHLAAR | FNKPD AEIVD | HYTYVILGDG | COMEGISQEA | CSLAGHWGLG | | | 256 |
| TKL1 | 119 |S....M | .MAQAN...T | Y...GFTLS | N....F.... | .LQ....S.. | S....LK.. | | | 178 |
| TKL2 | 119 |S....M | .IAQANF...T | Y.EDGFP.S | S..FA.V... | .LQ..V.S.T | S....LQ.. | | | 178 |
| TK-23 | 257 | KLIAFYDDNH | ISIDGDTEIA | FTEDVGARFE | ALGWHVIVVK | NGNTGYDEIR | AAIKEAKTVT | | | 316 |
| TKL1 | 179 | N...I....K | .T...A.S.S | .D...AK.Y. | .Y..E.LY.E | ...EDLAG.A | K..AQ..LSK | | | 238 |
| TKL2 | 179 | N..T...S.S |K.SYS | .D...LK.Y. | .Y..E.ME.D | K.DDDMES.S | S.LEK..LSK | | | 238 |
| TK-23 | 317 | DKPTMIKVT | TIGFGSPNKA | NSYSVHGSAL | GAKEVEATRS | NLGW-PYEPF | HVPEDVKSHW | | | 375 |
| TKL1 | 239 |L..M.. | ...Y..LHAG | -H....AP. | K.DD.KQLKS | KF.FN.DKS. | V..QE.YDHY | | | 297 |
| TKL2 | 239 |I..... |LQQG | TA-G..... | K.DD.KQLKK | RW.FD.NKS. | V..QE.YDYY | | | 297 |
| TK-23 | 376 | SRHVPEGAAL | EAG-WNTKFA | EYEKYPPEEA | AELKSITTGE | LPAGWEKALP | TYTPESPADA | | | 434 |
| TKL1 | 298 | QKTILKPGVE | ANNK.NKL.S | ..Q..F..LG | A..ARRLS.Q | ...N..SK.. | ...AKDS.V. | | | 357 |
| TKL2 | 298 | KKT.V.PGQK | LNEE.DR-.E | ..KT.F..KG | K..QRRLN.E | ..E...KH.. | KF..DDD.L. | | | 356 |
| TK-23 | 435 | TRNLSQQNLN | ALAKVLPGLF | GGSADLASSN | MTLMKMFPGDF | QKNTPEERN- | LRFVGREHGM | | | 493 |
| TKL1 | 358 | ..KL.ETV.E | DVYNQ..ELI |TP.. | L.RWKEAL.. | .PPSSGSG.Y | SGRYI.YGIR | | | 417 |
| TKL2 | 357 | ..KT...V.T | NMVQV..ELI |TP.. | L.RWEGAV.. | .PPITQLG.Y | AGRYI.YGVR | | | 416 |
| TK-23 | 494 | ----GAICNG | NALHSPGLIP | YCATFFVFTD | YMRGAMRISA | LSEAGVIYVM | THDSIGLGED | | | 549 |
| TKL1 | 418 | EHAM...M.. | ISAFGANYK. | .GG..LN.VS | .AA..V.L.. | ..GHP..W.A |V... | | | 477 |
| TKL2 | 417 | EHG-...M.. | ISAFGANYK. | .GG..LN.VS | .AA..V.LA. | ..GNP..W.A | | | | 475 |
| TK-23 | 550 | GPTHQPIEHL | ASFRAMPNIL | MFRPADGKET | AGAYKVAVLK | RKTPSILALS | RQKLPQLAGS | | | 609 |
| TKL1 | 478 |T.. | .H..SL...Q | VW.....N.V | SA...NSLES | KH....I... | ..N....E.. | | | 537 |
| TKL2 | 476 |T.. | .HL..I..HV | -W.....N.T | SA..YS.IKS | GR...VV... | ..N....EH. | | | 534 |
| TK-23 | 610 | SIEGAAGGY | ILSDNSSGNK | PDVILIGTGS | ELEIAVKAAD | ELR-KEGRAV | RVVSFVCWEL | | | 668 |
| TKL1 | 538 | ...S.S.... | V.Q.VA---N | ..I..VA... | .VSL.S.E..K | T.AA.NI..- | ...LPDFFT | | | 593 |
| TKL2 | 535 | .F.K.L.... | VIH.VE---N | ..I..VS... | .VS.SID..K | K.YDTKKIKA | ...LPDFYT | | | 591 |
| TK-23 | 669 | FEEQSADYKE | SVLPSSVTAR | VSIEAGSTFG | WEKYVGSKGK | AIGIDRWGAS | APAGRIYKEY | | | 727 |
| TKL1 | 595 | .DK.PLE.RL |DN.PIM | -V.VLA.TC | .G..AHQSFG | IDRFGAS.KA | PEVF.FFGFT | | | 652 |
| TKL2 | 592 | .DR..EE.RF |DG.PIM | -F.VLA.SS | .G..AHQSFG | LDEFGRS.KG | PEIY.LFDFT | | | 650 |
| TK-23 | 728 | GITAEAVVAA | AKQVS | | | | | | | 743 |
| TKL1 | 653 | PEGVAERAQK | TIAFYKGDKL | ISPLKKAF | | | | | | 680 |
| TKL2 | 651 | ADGVASRAEK | TINYKKGKQL | LSPMGRAF | | | | | | 678 |

Abbildung 4

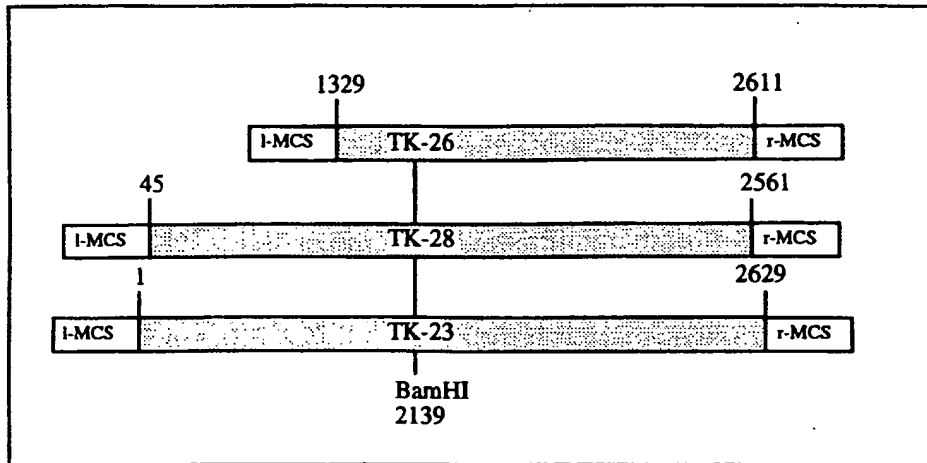
Gewebespezifische Expression der plastidären Transketolase in Tabakpflanzen



Legende: Spur 1, Sink-Blatt; Spur 2, Source-Blatt; Spur 3, Blütenknospe;
Spur 4, Internodien; Spur 5, Nodien; Spur 6, Cortex; Spur 7, Wurzel;
Spur 8, geöffnete Blüte

Abbildung 5

Aufbau der Transketolase cDNA-enthaltenden Plasmide



l-MCS: Linke Polylinkersequenz

SacI-----SacII-----NotI-----XbaI-----SpeI-----BamHI-----SmaI-----PstI-----EcoRI-----NotI
 5'- GAGCTCACC GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGCGGCCGC-3'

r-MCS: Rechte Polylinkersequenz

NotI-----EcoRI-----EcoRV-----HindIII-----Sall-----HincII-----XbaI-----KpnI
 5'- GCGGCCCGCAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGCCCCGGTACC-3'

Abbildung 6

Konstruktion pflanzlicher Expressionskassetten zur Antisense-Inhibierung der plastidären Transketolase

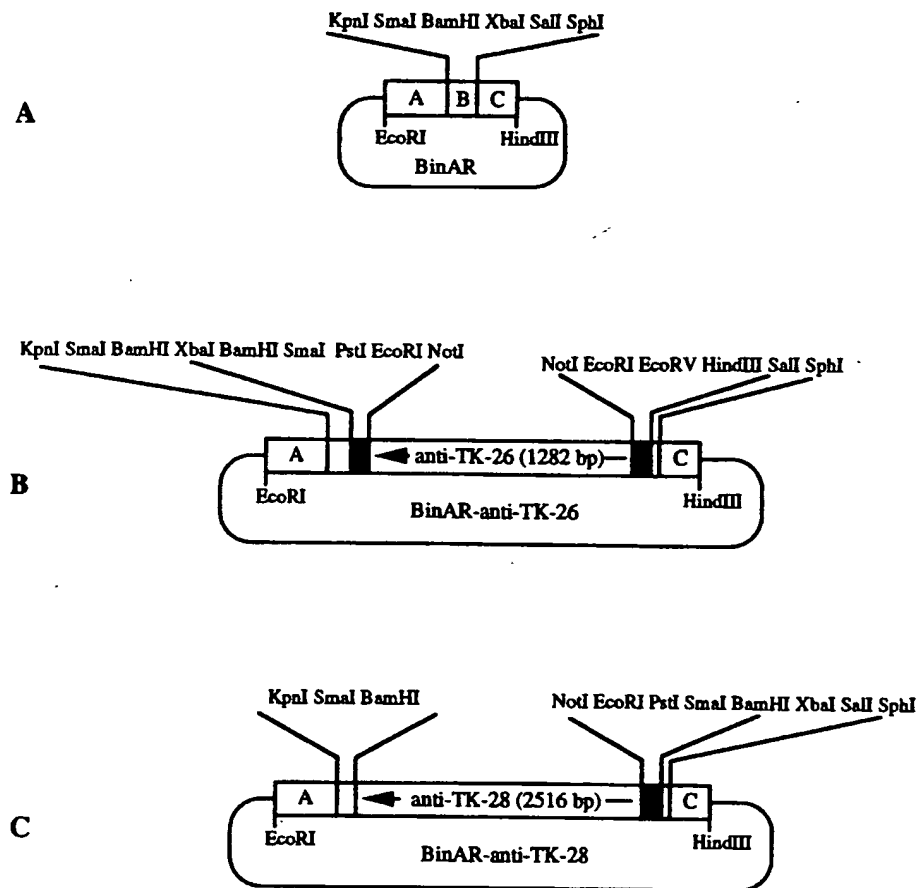
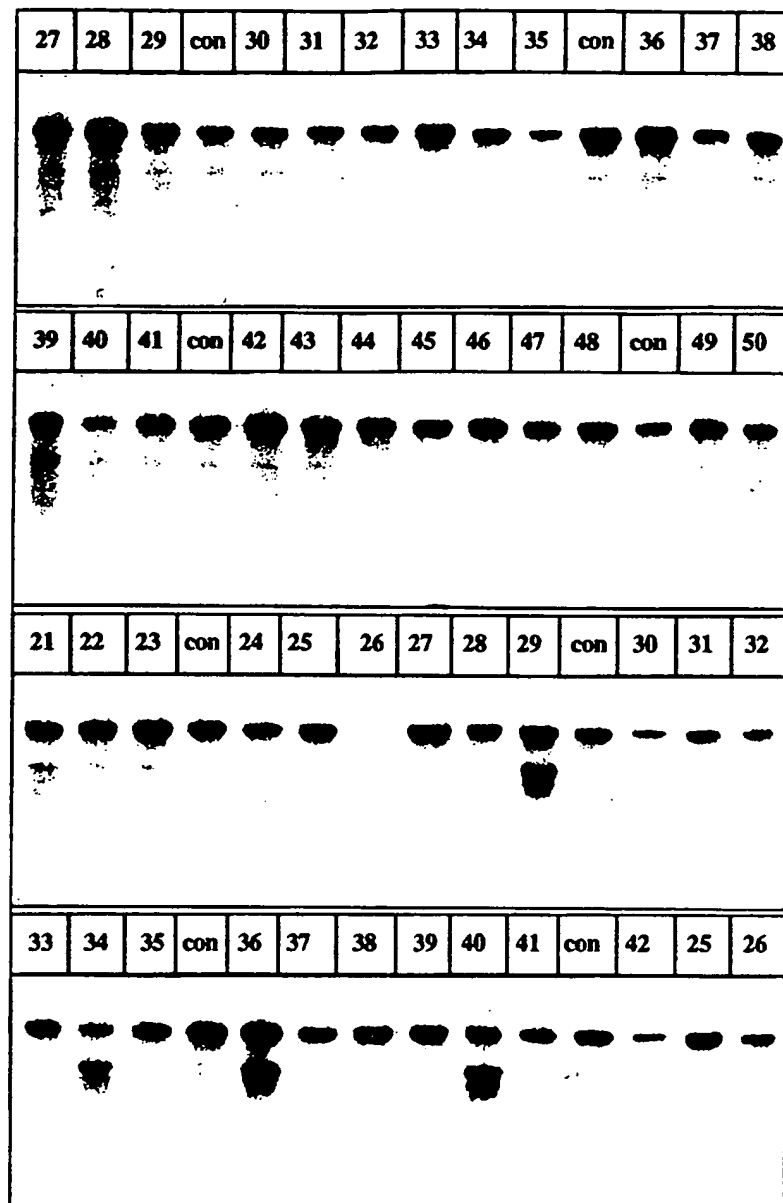


Abbildung 7

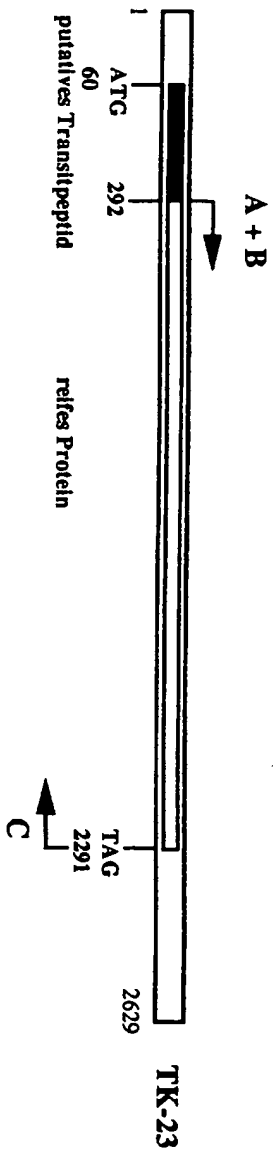
**Antisense Inhibierung der plastidären Transketolase in transgenen Tabakpflanzen:
RNA-Analyse der Transformanten in Gewebekultur**



Legende: Nummern, Bezeichnung der einzelnen unabhängigen Transformanten; con, untransformierte Kontrolle; A und B, Antisense-Konstrukt TK-28; C und D, Antisense-Konstrukt TK-26

Abbildung 8

PCR-Amplifikation der plasmidären Transketolase



PCR-Primer:

A: 5'-AA GTC GAC GAA TTC AAA ATC GAG ACT GCG CTT GTT GAC-3'
 38mer SalI EcoRI TK reifes Protein

B: 5'-AA GAA TTC ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT AAA ATC GAG ACT GCG CTT GTT GAC-3'
 53mer EcoRI Met 6 x His TK reifes Protein

C: 5'-TT GTC GAC GAA TTC CTA AGA AAC TTG TTT AGC TGC AGC-3'
 38mer SalI EcoRI Stop

Abbildung 9

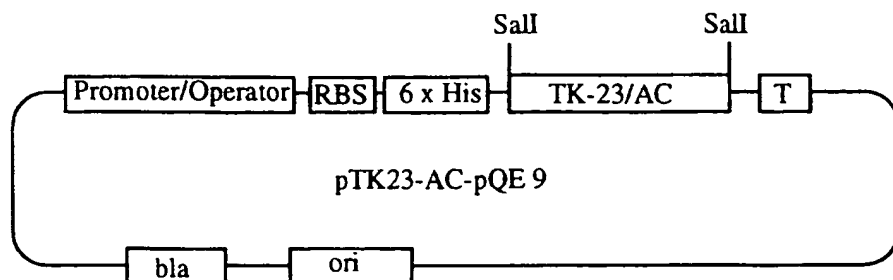


Abbildung 10

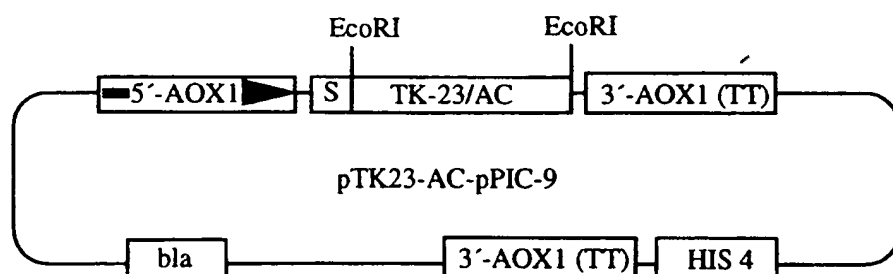


Abbildung 11

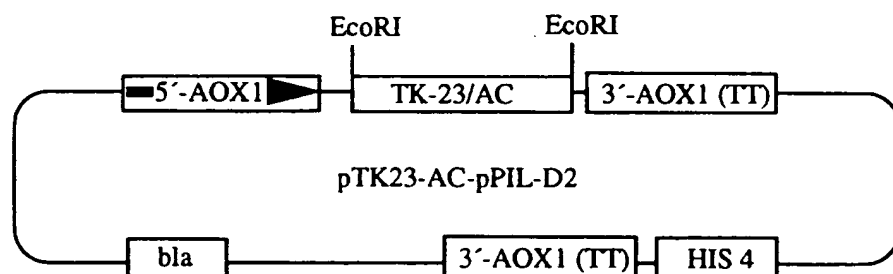


Abbildung 12

Expression der plastidären Transketolase in *E. coli* Zellen

| Bakterienkultur | Kontrolle | TK-Antisense | TK-Sense | | | |
|-----------------|-----------|--------------|----------|---|---|---|
| IPTG | + | - | + | - | + | - |

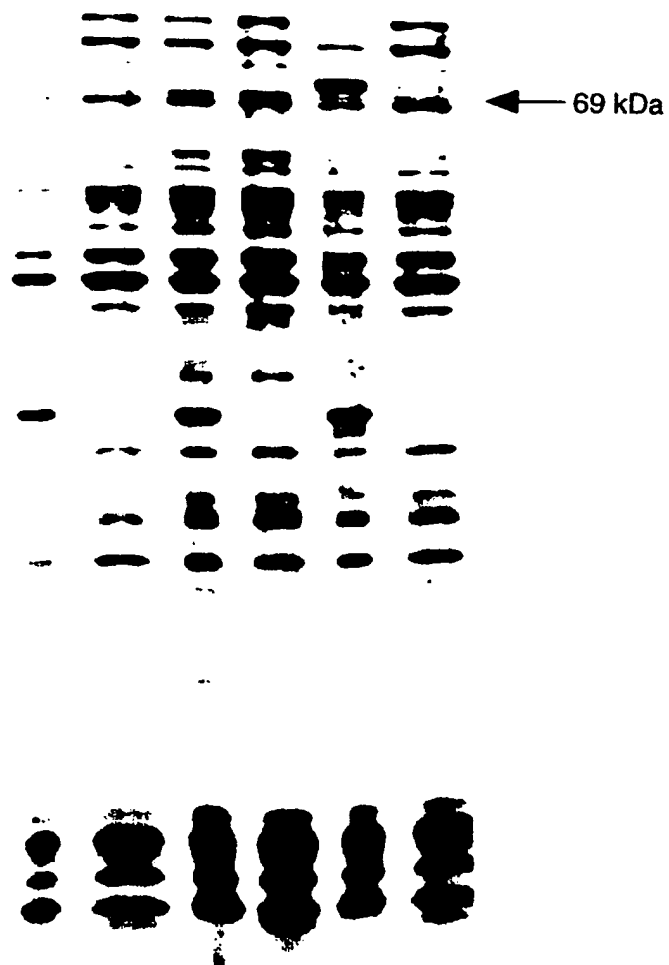


Abbildung 13